

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510112382.8

[51] Int. Cl.

G12N 15/51 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

A61K 39/29 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

G01N 33/576 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 6 月 10 日

[11] 授权公告号 CN 100497630C

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[22] 申请日 2005.12.30

[21] 申请号 200510112382.8

[73] 专利权人 上海复星长征医学科学有限公司

地址 200433 上海市杨浦区翔殷路 995 号

[72] 发明人 龚育平

[56] 参考文献

WO0198333 A2 2001.12.27

CN 1277206 A 2000.12.20

含前 S1 区的乙肝表面抗原嵌合基因的构建
及在毕赤酵母中的表达. 谭昌耀等. 微生物学
免疫学进展, 第 33 卷第 1 期. 2005

乙肝病毒大分子表面抗原 PreS1 区相关片段的
表达、免疫性质及应用. 胡维国. 博士论
文, 中国科学院上海生命科学研究院生物化学
与细胞生物学研究所. 2004

审查员 杨振宇

[74] 专利代理机构 上海新天专利代理有限公司

代理人 王 巍

权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图 4 页

[54] 发明名称

乙型肝炎病毒前 S1 区多表位抗原的基因克隆
及其编码序列

[57] 摘要

本发明涉及生物工程技术领域, 本发明公开了
乙型肝炎病毒前 S1 区 (PreS1) 多表位抗原的基因克
隆 preslme 及其编码序列 PRES1ME。preslme 包含
了 HBV 基因组前 S1 区中 B 细胞表位区段 4 段, 经
研究表明, 它与 gst 基因的原核融合表达产物 GST -
PRES1ME 与乙肝前 S1 抗原 ELISA 检测试剂盒的反
应结果为阳性, 用其制备 ELISA 板后可在乙肝血清
中检测出乙肝前 S1 抗体, GST - PRES1ME 免疫小
鼠后的血清能特异识别四条 Pres1 表位合成肽及前
S1 全长蛋白。因此, preslme 及其表达产物
PRES1ME 可用于制备 HBV 前 S1 抗体或抗原的检测
试剂及乙肝疫苗。

1. 一种乙型肝炎病毒前 S1 区多表位抗原的基因克隆 *pres1me*, 其特征在于它包含了 HBV 基因组前 S1 区中 B 细胞表位区段 4 段, 各表位区段基因之间以甘氨酸-丙氨酸-甘氨酸-丙氨酸-丝氨酸-丝氨酸-丝氨酸的编码序列为接头串联而成, *pres1me* 的核苷酸序列如下:

atgccattaggtttcttcccagaccaccaattagaccagctttcggtgctaactctaacaaccagacttcaactcgg
tgccggtgcctcttctctcccattaggtttcttcccagaccaccaattcgaccagctttcaaagctaactctgacaacc
agactccgacttcaacttcggtgccggtgcctcttctcgggtggttattaggttggtctggtgccggtgcctcttctc
cttcggtgctaactctaacaaccagactgggacttcaacttcaacaaagaccactggccagaagctaaccaagtgg
ttag。

2. 一种乙型肝炎病毒前 S1 区多表位抗原的基因克隆编码蛋白 PRES1ME, 其特征在于其氨基酸序列如下:

METProLeuGlyPhePheProAspHisGlnLeuAspProAlaPheGlyAlaAsnSerAsnAsnProAspPheAs
nPheGlyAlaGlyAlaSerSerSerProLeuGlyPhePheProAspHisGlnPheAspProAlaPheLysAlaAsnS
erAspAsnProAspSerAspPheAsnPheGlyAlaGlyAlaSerSerSerGlyGlyLeuLeuGlyTrpSerGlyAla
GlyAlaSerSerSerPheGlyAlaAsnSerAsnAsnProAspTrpAspPheAsnPheAsnLysAspHisTrpPro
GluAlaAsnGlnValGly。

3. 根据权利要求 1 所述的一种乙型肝炎病毒前 S1 区多表位抗原的基因克隆 *pres1me* 在制备 HBV 核酸疫苗或多肽疫苗中的应用。
4. 根据权利要求 2 所述的一种乙型肝炎病毒前 S1 区多表位抗原的基因克隆编码蛋白 PRES1ME 在制备 HBV 前 S1 抗体或抗原的检测试剂中的应用。
5. 根据权利要求 2 所述的一种乙型肝炎病毒前 S1 区多表位抗原的基因克隆编码蛋白 PRES1ME 在制备 HBV 多肽疫苗中的应用。

乙型肝炎病毒前 S1 区多表位抗原的基因克隆及其编码序列

技术领域

本发明涉及生物工程技术领域，具体涉及一种乙型肝炎病毒前 S1 区（PreS1）多表位抗原的基因克隆 *pres1me* 及其编码蛋白 PRES1ME 与它们在乙肝疫苗制备及乙型肝炎病毒前 S1 抗体或抗原诊断中的应用。

背景技术

乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus, HBV)的感染是一个很严重的全球性的健康问题。在中国、东南亚及非洲等高发地区，约有 10% 人口感染或曾经感染过 HBV。HBV 基因组包括 4 个互相具有不同程度重叠的开放阅读框架(ORF)。ORF—S 编码乙肝表面抗原主蛋白、中蛋白和大蛋白，它们分别由同一阅读框内的 3 个不同部位的 ATG 起始编码，因而具有相同的 C 末端。大蛋白在中蛋白起始密码子上游开始翻译，它比中蛋白分子的 N 端多一段长度为 119 或 108 个氨基酸序列的 PreS1 区域。

乙肝 PreS1 区域为乙型肝炎病毒(HBV)外膜蛋白的重要组成部分，主要存在于 Dane 颗粒和管型颗粒上，参与 HBV 的组装、分泌和侵入肝细胞的机制，在 HBV 感染肝细胞和机体免疫应答方面起重要作用[参见：Ryu CJ. 等人，J Med Virol, 52(2): 226-233 (1997)]。有研究表明，PreS1 抗体的产生对于乙肝急性感染的恢复和慢性乙肝患者病情的缓解具有重要意义[分别参见：Wei J. 等人，World J Gastroenterol, 8(2): 276-281 (2002)；Wei J. 等人，Clin Chim Acta, 317(1-2): 159-169 (2002)；Budkowska A. 等人，Hepatology, 6(3): 360-383 (1986)]。PreS1 区域高度亲水，不含 Cys 残基，不存在二硫键，因此用 PreS1 部分序列的合成肽或基因表达产物来研究该区域表位及其相关抗体成为可能。PreS1(21~47 aa)肽段是 HBV 特异性结合肝细胞的主要位点，同时，PreS1 序列中含有丰富的 T 细胞与 B 细胞表位，其中相当一部分位于 21~47 aa 区域，因而 PreS1(21~47 aa)区 段具有良好的免疫原性，在 HBV 感染早期就能诱导产生相应抗体[分别参见：Neurath AR. 等人，Cell, 46(3): 429-436 (1986)；Hui J. 等人，Vaccine, 17(13-14): 1711-1718 (1999)]。抗 PreS1(21~47aa)抗体参与病毒的清除和中和，具有保护作用，被认为是预示乙肝患者康复的重要标志，因此，抗 PreS1(21~47 aa)抗体的检测具有重要的临床

诊断意义。

除此之外，众多文献也对 PreS1 中的抗原表位进行了报道，其中 ad 型 PreS1 中可能含 B 细胞表位的区段主要有：preS1 (16-27)，preS1 (32-53)，preS1 (41-53)，preS1 (94-105)和 preS1 (106-117)[参见：Milich DR. 等人，J Immunol, 138(12): 4457-4465 (1987)]，pres1(30-35)[参见：Kuttner G. 等人，Mol Immunol, 36(10): 669-683 (1999)]，preS1 (19-26)和 preS1 (37-45)[参见：Maeng CY.等人，Virology, 270(1): 9-16 (2000)]，preS1 (37-43)[参见：Pizarro JC. 等人，FEBS Lett, 509(3): 463-468 (2001)]，preS1 (12-52)[参见：Petre J. 等人，Arch Virol Suppl, 4: 137-141 (1992)]，preS1 (1-42)[参见：Prange R. 等人，J Gen Virol, 76 (Pt 9): 2131-2140 (1995)]，preS1 (27-35) 和 preS1 (72-78)[参见：Kuroki K. 等人，Virology, 176(2): 620-624 (1990)]，preS1 (34-59)[参见：Hu WG. 等人，Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 36(6): 397-404 (2004)]，ay 型 Pres1 中可能含 B 细胞表位的区段主要有 preS1 (37-43)[参见：Pizarro JC. 等人，FEBS Lett, 509(3): 463-468 (2001)]，这些表位均被尝试用于新型乙肝疫苗的研制以及 PreS1 抗体的检测等研究中。

抗 PreS1 抗体检测的方法已有相关文献报道[分别参见：Theilmann L. 等人，Hepatology, 6(2): 186-190 (1986)；Alberti A. 等人，Hepatology, 12(2): 199-203 (1990)]，基本上是以人工合成 PreS1 肽段作为包被抗原的间接 ELISA，但往往在灵敏度、稳定性等方面尚有不足之处。

发明内容

本发明所要解决的技术问题在于克服上述不足之处，研究设计更有效的乙型肝炎病毒前 S1 区多表位抗原的基因克隆及其编码序列。

本发明提供一种乙型肝炎病毒前 S1 区多表位抗原的基因克隆 *pres1me* 及其编码序列 PRES1ME。

本发明构建的 *pres1me* 包含了 HBV 基因组 Pres1 区中 B 细胞表位基因 4 条。各表位的氨基酸序列见序列表 1 (SEQ ID NO.1-4)。

1. 本发明将各表位之间以七个氨基酸的编码序列为接头，通过 PCR 方法合成由上述 4 条表位基因串联而成的多表位抗原的基因克隆。但各表位抗原基因的设计，是采用大肠杆菌偏性密码子并适当应用毕赤酵母偏性密码子，以便既可在原核细胞中表达，也可在真核细胞中表达。表位之间接头的设计，采用各表位之间为甘氨酸-丙氨酸-甘氨酸-丙氨酸-丝氨酸-丝氨酸-丝氨酸，以使各表位相对独立。

preslme 的核苷酸序列如下:

```
atgccattaggtttcttcccagaccaccaattagaccagcttgcggtgctaactctaacaacccagacttcaactcg
gtgccggtgccttctctcccattaggtttcttcccagaccaccaattcgaccagcttcaaagctaactctgacaac
ccagactccgacttcaacttcggtgccggtgccttctctccggtggtttattaggttggtctggtgccggtgccttctcc
tcttcggtgctaactctaacaacccagactgggacttcaacttcaacaagaccactggccagaagctaaccaagtt
ggtag。
```

本发明的另一目的是提供了乙型肝炎病毒前 S1 区多表位抗原基因克隆 *preslme* 的构建, 采用混合 PCR 合成基因和酶切、连接相结合的方法, 包括如下步骤:

- 1、合成相应的 9 条寡核苷酸片段, 这 26 条寡核苷酸片段中分别有相应片段在 5' 端和 3' 端彼此互补。其中 5' 端互补的片段编号分别为 2 号和 3 号、4 号和 5 号、6 号和 7 号、8 号和 9 号; 3' 端互补的片段编号分别 1 号和 2 号、3 号和 4 号、5 号和 6 号、7 号和 8 号; 9 条寡核苷酸片段的核苷酸序列见序列表 2 (SEQ ID NO. 5-13), 该 9 条寡核苷酸片段既是引物也是模板。
- 2、用混合 PCR 方法, 将序列表 2 中 9 条寡核苷酸片段合成本发明全长基因克隆 *preslme*; 将 *preslme* 与原核或真核重组表达载体连接并转化相应菌株或细胞后, 可表达 *preslme* 编码的蛋白 PRES1ME。

PRES1ME 的氨基酸序列如下:

```
METProLeuGlyPhePheProAspHisGlnLeuAspProAlaPheGlyAlaAsnSerAsnAsnProAspPheA
snPheGlyAlaGlyAlaSerSerSerProLeuGlyPhePheProAspHisGlnPheAspProAlaPheLysAlaAsn
SerAspAsnProAspSerAspPheAsnPheGlyAlaGlyAlaSerSerSerGlyGlyLeuLeuGlyTrpSerGlyA
laGlyAlaSerSerSerPheGlyAlaAsnSerAsnAsnProAspTrpAspPheAsnPheAsnLysAspHisTrpPr
oGluAlaAsnGlnValGly。
```

本发明的乙型肝炎病毒前 S1 区多表位抗原基因克隆 *preslme* 及其编码蛋白 PRES1ME 具有如下特点:

- 1、应用大肠杆菌偏性密码子并兼顾应用毕赤酵母偏性密码子来设计基因, 使 *preslme* 基因在原核和真核细胞中都能得到有效表达, 为规模型生产奠定基础。
- 2、各表位之间用甘氨酸-丙氨酸-甘氨酸-丙氨酸-丝氨酸-丝氨酸-丝氨酸分开, 为各表位都能被有效提呈提供了条件。
- 3、利用乙型肝炎病毒前 S1 区多表位抗原基因克隆, 可以研制多种乙肝病毒前 S1 区抗体或抗原的检测试剂, 用于 HBV 患者的诊断, 可以研制多种形式、兼有防治功能的乙型肝炎候选疫苗, 用于 HBV 感染的防治。

附图说明

图 1. pMD-PRES1ME 重组质粒结构示意图

图 2. *pres1me* 基因合成示意图

图 3. 重组质粒 pMD-PRES1ME 的构建流程图

图 4. 原核融合表达质粒 pGEX-PRES1ME 的构建流程图

图 5. 鼠抗 GST-PRES1ME 血清与 4 条 Pres1 区表位合成肽及基因工程表达的乙肝前 S1 蛋白的交叉反应性图

具体实施方式

乙型肝炎病毒前 S1 区多表位抗原基因克隆(*pres1me*)的具体构建方法如下:

- 一、合成 *pres1me* 基因所需的 9 条寡核苷酸片段(见 SEQ ID NO. 5-13, 由上海申能博彩生物技术公司合成)。
- 二、9 条寡核苷酸片段既是引物也是模板, 经 PCR 反应合成乙型肝炎病毒前 S1 区多表位抗原基因, PCR 合成和拼接反应均应用 Expand™ Long Template PCR 系统。

pres1me 基因的合成(图 2)

1-9号寡核苷酸片段(30μM)	各 0.5μl
dNTP(10mM)	2.0μl
10×PCR buffer	5.0μl
DNA聚合酶混合液(10单位/μl)	1.0μl
灭菌重蒸水	35μl

按下述条件进行 PCR 反应: 94℃ 30 秒、65℃ 30 秒、74℃ 1 分钟, 进行 35 个循环, 然后 74℃ 延伸 10 分钟。

- 三、按常规将 PCR 合成后纯化的 *pres1me* 基因与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α, 涂布 Amp⁺ 琼脂培养平板, 37℃ 过夜, 挑取 8 个克隆进行小量质粒抽提, 所得质粒经酶切及 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 确认获得阳性克隆。重组质粒命名为 pMD-PRES1ME。(图 3)

- 四、取 pMD-PRES1ME 质粒进行核苷酸序列测定。结果表明, *pres1me* 基因全长

324bp, 其核苷酸序列及相应的氨基酸序列分别见序列表 3 和序列表 4 (SEQ ID NO.14 和 SEQ ID NO.15), 与所设计的序列相同。

乙型肝炎病毒前 S1 区多表位抗原基因 (*pres1me*) 同 *gst* 基因融合表达

一、构建原核融合表达质粒 pGEX- PRES1ME

重组质粒 pMD-PRES1ME 经 BamHI /SalI 双酶切后, 回收目的片段。原核融合表达载体 pGEX-4T-1 经 BamHI/SalI 双酶切后, 回收载体片段。两个片段在 DNA 连接酶作用下于 16℃连接过夜, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 涂布 Amp⁺ 琼脂培养平板, 37℃过夜, 挑取 16 个克隆进行小量质粒抽提, 用 BamHI/SaI 酶切及 1%琼脂糖凝胶电泳, 鉴定出阳性克隆。重组质粒命名为 pGEX-PRES1ME。(图 4)

二、筛选高效表达克隆

从上述鉴定出的 pGEX-PRES1ME 阳性克隆中挑取 6 株菌, 用转入空白载体 pGEX-4T-1 的 2 株菌作对照, 分别在 3mL 的 LB 培养基中 37℃扩增 12h, 加入 IPTG(异丙基硫代半乳糖苷)至终浓度为 0.1mmol/L 诱导 3h。诱导结束后各取 1mL 菌液, 常规处理及 7.5%PAGE 电泳检测, 根据肉眼观察电泳条带中目的蛋白条带浓度来筛选高效表达克隆。

三、优化诱导表达条件

用上述筛选获得的高效表达株进一步实验优化诱导表达条件。首先, 确定诱导的菌液浓度, 在 3mL 的 LB 培养基中, 新鲜过夜培养菌液按 1:100 接种, 于 37℃培养, 高速振摇 280rpm/min, 取不同时间点测定 OD₆₀₀ 值, 在不同 OD₆₀₀ 值下以 0.1mmol/L IPTG 诱导 3h, 收集菌液 1mL, 检测蛋白表达情况。而后, 确定 IPTG 诱导的温度, 以菌液 OD₆₀₀ 约为 1.0 时开始诱导, 分别在 20℃、25℃、28℃、30℃及 37℃诱导 3h, 收集菌液 1mL, 检测蛋白表达量。而后, 在菌液 OD₆₀₀ 约为 1.0, 诱导温度 28℃, IPTG 浓度 0.1mmol/L 条件下, 确定诱导时间, 取诱导 1h、2h、3h 及 4h 的菌液 1mL, 检测蛋白表达量。最终确定菌液 OD₆₀₀=1.0、温度为 28℃、IPTG 浓度为 0.1mmol/L、诱导时间为 3h 为最佳诱导表达条件。

四、融合蛋白 GST-PRES1ME 的大量表达和亲和层析纯化

应用上述确定的诱导表达条件, 并优化超声破碎条件和洗脱条件来大量获得融合蛋白 GST-PRES1ME。具体步骤: 将重组菌划 Amp⁺ 琼脂培养平板, 37℃过夜。挑取单克隆菌落在 10mL 的 LB 培养基中 37℃扩增 12h, 而后, 按 1:100 接种稀释接种于预热的 LB 培养基中, 高速振摇 2h, 加入 IPTG 至终浓度为 0.1mmol/L, 于 28℃诱导 3h。用 8000rpm/min×10min 4℃离心收集菌体, 对应 1mL 菌液用 50 μL 冰预冷的 1×PBS 悬浮细菌, 在冰浴中进

加入 DTT 辅助破碎。而后，破碎液内加入 20%的 TritonX-100 至终浓度 1%，室温下低速振荡 30min，溶解蛋白。用 12000rpm/min×10min 4℃离心后将上清转移到干净的器皿中，即为胞浆蛋白提取液。用 1×PBS 平衡 10mL 的 Glutathione Sepharose™ 4B 后，加入上述胞浆蛋白提取液，控制流速 1mL/min，用 10 倍柱床体积的 1×PBS 洗至基线后，用 10mmol/L 的还原性谷胱甘肽（溶于 50mmol/L Tris-HCl, pH8.0），洗脱 GST-PRES1ME 蛋白。蛋白经透析除盐、冷冻干燥后，用纯水溶解，用 Bradford 法测定浓度

pres1me 同 *gst* 基因融合表达产物 GST-PRES1ME 的免疫原性研究

一、GST-PRES1ME 与乙肝前 S1 抗原 ELISA 检测试剂盒的反应性

所用乙肝前 S1 抗原 ELISA 检测试剂盒为上海复星长征医学科学有限公司产品。将 GST-PRES1ME 蛋白用 PBS 稀释为 1mg/ml、0.1mg/ml、0.01mg/ml 三种不同浓度，用乙肝前 S1 抗原 ELISA 检测试剂盒进行检测，同时选用 1mg/ml、0.1mg/ml、0.01mg/ml 三种不同浓度的 GST 蛋白为对照。具体操作步骤见试剂盒说明书。

结果见表 1：

表 1、GST-PRES1ME 与乙肝前 S1 抗原 ELISA 检测试剂盒的反应结果

样品	OD _{450/630}	结果
GST-PRES1ME (1mg/ml)	>3.0	+
GST-PRES1ME (0.1mg/ml)	1.347	+
GST-PRES1ME (0.01mg/ml)	0.216	+
GST (1mg/ml)	0.085	-
GST (0.1mg/ml)	0.040	-
GST (0.01mg/ml)	0.038	-

二、GST-PRES1ME 与乙肝患者血清的反应性

用 ELISA 方法检测。方法是以纯化的 GST-PRES1ME 包被酶标板，检测 160 例临床血清标本。具体步骤如下：

- 1、包被：纯化的 GST-PRES1ME 用包被液稀释为 0.5mg/ml，加 100 μg/孔，于 4℃包被过夜。
- 2、封闭：弃掉包被液，拍干，加封闭液 200 μl/孔，4℃封闭过夜。

- 3、准备：弃掉封闭液，将板条置于室温干燥过夜。
- 4、加样：用样品稀释液按 1：10 稀释待测血清，按 100 μ l/孔加入检测孔中，以样品稀释液作为空白对照，所有检测均设复孔。
- 5、孵育：粘上封板纸，置 37℃恒温反应 30 分钟。
- 6、洗板：用洗板机洗板五次，拍干。
- 7、酶标：每孔加酶标二抗工作液（HRP-羊抗人 IgG 1：1000 稀释）100 μ l，粘上封板纸，置 37℃恒温反应 30 分钟。
- 8、洗板：同前(6)。
- 9、显色：每孔加 TMB 显色剂 A、B 各 50 μ l，37℃避光显色 10-15 分钟。
- 10、终止：每孔中加终止液 50 μ l，轻轻混匀，终止反应。
- 11、比色：测双波长 OD450nm/630nm，空白孔校零，酶标检测仪测光吸收值。
- 12、结果判定：OD 待测样本 ≥ 0.105 时为阳性；反之为阴性。

结果见表 2

表 2、GST-PRES1ME 与乙肝患者血清的反应性

组别	血清份数	前S1抗体 (+)	阳性率
乙肝两对半指标为：2+、2 5+、 2 4 5+	32	22	68.8%
乙肝两对半指标为：1 2 4 5+	3	1	33.3%
乙肝两对半指标为：1 4 5+	81	30	37.0%
乙肝两对半指标为：1 3 5+	15	4	26.7%
乙肝两对半指标为：1 3 4 5+	2	0	0
乙肝两对半指标为：5+、4 5+	8	1	12.5%
乙肝全阴	19	0	0

由表 2 数据计算可知用 GST-PRES1ME 进行血清中前 S1 抗体检测时，在乙肝患者血清（以乙肝两对半五项指标出现任何一项阳性为标准）中的检出率为 41.1%，在非乙肝患者（以乙肝两对半五项指标全阴为标准）中的检出率为 0，具有良好的灵敏度和特异性。

三、抗 GST-PRES1ME 与 4 条 Pres1 区表位合成肽及基因工程表达的 Pres1 蛋白的反应性

1、动物免疫及免疫血清的收集

① 制备 GST-PRES1ME 乳化液

将纯化的 GST-PRES1ME 经干燥后用纯水溶解，调整蛋白浓度为 0.2 μ g/ μ

1, 加入等体积的完全弗氏佐剂(首次接种时)和不完全弗氏佐剂(加强免疫时)后, 用超声破菌器在 100w 功率下, 冰水浴中多次乳化(一次乳化 2mL, 共需 10 次左右), 取乳化后液体 5~10 μ l 滴入冷水中, 油滴浮于水面而不分散者为乳化完全。

② 免疫动物

免疫用 BALB/c 小鼠购于上海第二军医大学实验动物中心, 雄性, 健康 6 周龄。将小鼠背部皮肤酒精消毒, 选择 3~4 个部位分别注射乳化液 0.1~0.5ml/处, 接种剂量为首次注射 0.1 mg/只·次, 加强注射为 0.04 mg/只·次, 0、3、6 周各接种一次, 同时设 PBS 免疫对照组, 每组小鼠各为 6 只。分别于 0、2、5、8、11、14、20、40 周采血, 血液置室温中凝固约 1h, 然后置 4℃过夜进一步收缩血块, 第 2 天 4℃下 10000rpm/min×10min, 收集上清液即为血清, 并及时分装冻存。

2、鼠抗 GST-PRES1ME 血清与 Pres1 区表位合成肽及基因工程表达的 Pres1 蛋白的反应性

以 4 条不同的 Pres1 区合成肽[氨基酸序列见 (SEQ ID NO. 4)]及原核表达的 Pres1 蛋白分别包被 Immunoplate Maxisorp 检测板, 应用 ELISA 方法检测免疫小鼠血清中是否含有特异识别 4 条 Pres1 区表位合成肽及 Pres1 蛋白的特异性抗体(结果见图 5)。由图可以看出, 4 条肽及 Pres1 蛋白均可被鼠抗 GST-PRES1ME 血清识别。此结果提示, GST-PRES1ME 中所包含的 4 条表位均能诱导机体产生相应的抗体, 此抗体能特异识别前 S1 抗原, 预示其作为疫苗应用时, 可能具有诱导保护性抗体的能力。

由以上结果表明, 本发明乙型肝炎病毒多表位抗原的基因克隆 *pres1me* 及其编码的蛋白 PRES1ME, 可用于制备 HBV 前 S1 抗体或抗原的检测试剂, 也可用于制备 HBV 核酸疫苗及多肽疫苗。

SEQUENCE LISTING

<110> 上海复星长征医学科学有限公司

<120>乙型肝炎前 S1 区多表位抗原的基因克隆及其编码序列

<160> 15

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 27

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<400> 1

Pro	Leu	Gly	Phe	Phe	Pro	Asp	His	Gln	Leu	Asp	Pro	Ala	Phe	Gly	Ala
1				5					10					15	

Asn	Ser	Asn	Asn	Pro	Asp	Trp	Asp	Phe	Asn	Pro
			20					25		

<210> 2

<211> 27

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<400> 2

Pro	Leu	Gly	Phe	Phe	Pro	Asp	His	Gln	Leu	Asp	Pro	Ala	Phe	Lys	Ala
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1	5	10	15
---	---	----	----

Asn	Ser	Asp	Asn	Pro	Asp	Trp	Asp	Leu	Asn	Pro
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

20

25

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<400> 3

Gly	Gly	Leu	Leu	Gly	Trp	Ser
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1

5

<210> 4

<211> 26

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<400> 4

Phe	Gly	Ala	Asn	Ser	Asn	Asn	Pro	Asp	Trp	Asp	Phe	Asn	Pro	Asn	Lys
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1

5

10

15

Asp	His	Trp	Pro	Glu	Ala	Asn	Gln	Val	Gly
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

20

25

<210> 5

<211> 51

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<400> 5

cggatccgaa ttcatgccat taggtttctt cccagaccac caattagacc c
51

<210> 6

<211> 60

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<400> 6

aagttgaagt ctgggttggt agagtttagca ccgaaagctg ggtctaattg gtggtctggg
60

<210> 7

<211> 59

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<400> 7

aacaaccag acttcaactt cggtgccggt gcctcttcct cccattagg tttcttccc
59

<210> 8

<211> 60

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<400> 8

gtcagagtta gctttgaaag ctgggtcgaa ttggtggtct gggaagaaac ctaatgggga
60

<210> 9

<211> 58

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<400> 9

ctttcaaagc taactctgac aaccagact ccgacttcaa cttcggtgcc ggtgcctc
58

<210> 10

<211> 60

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<400> 10

ggcacccggca ccagaccaac ctaataaacc accggaggaa gaggcaccgg caccgaagtt
60

<210> 11

<211> 60

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<400> 11

ttgggtctggg gccgggtgcct cttcctcctt cgggtgctaac tctaacaacc cagactggga
60

<210> 12

<211> 59

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<400> 12

tggttagctt ctggccagtg gtctttgttg aagttgaagt cccagtctgg gttgttaga
59

<210> 13

<211> 45

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<400> 13

cactggccag aagctaacca agttggtag gcggccgcgt cgacg
45

<210> 14

<211> 324

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<400> 14

atgccattag gtttcttccc agaccaccaa ttagaccag ctttcggtgc taactctaac
60

aaccagact tcaacttcgg tgccggtgcc tcttctctcc cattaggttt cttcccagac
120

caccaattcg acccagcttt caaagctaac tctgacaacc cagactccga cttcaacttc
180

ggtgccggtg cctcttcttc cggtaggttta ttaggttggt ctggtgccgg tgccctcttc
240

tccttcggtg ctaactctaa caaccagac tgggacttca acttcaacaa agaccactgg
300

ccagaagctaaccaagttggttag
324

<210> 15

<211> 107

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<400> 15

Met	Pro	Leu	Gly	Phe	Phe	Pro	Asp	His	Gln	Leu	Asp	Pro	Ala	Phe	Gly
1				5					10					15	

Ala	Asn	Ser	Asn	Asn	Pro	Asp	Phe	Asn	Phe	Gly	Ala	Gly	Ala	Ser	Ser
			20					25					30		

Ser Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Phe Asp Pro Ala Phe Lys
35 40 45

Ala Asn Ser Asp Asn Pro Asp Ser Asp Phe Asn Phe Gly Ala Gly Ala
50 55 60

Ser Ser Ser Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Gly Ala Gly Ala Ser Ser
65 70 75 80

Ser Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Phe Asn
85 90 95

Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly
100 105

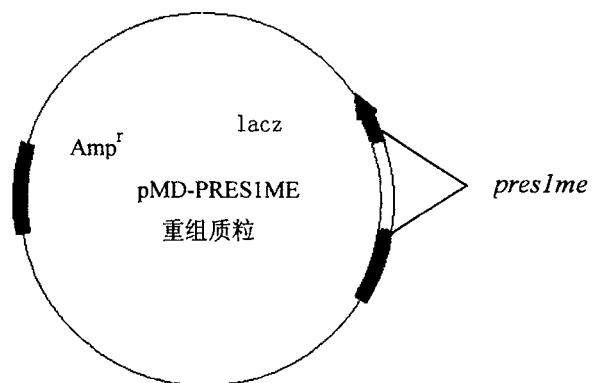


图 1

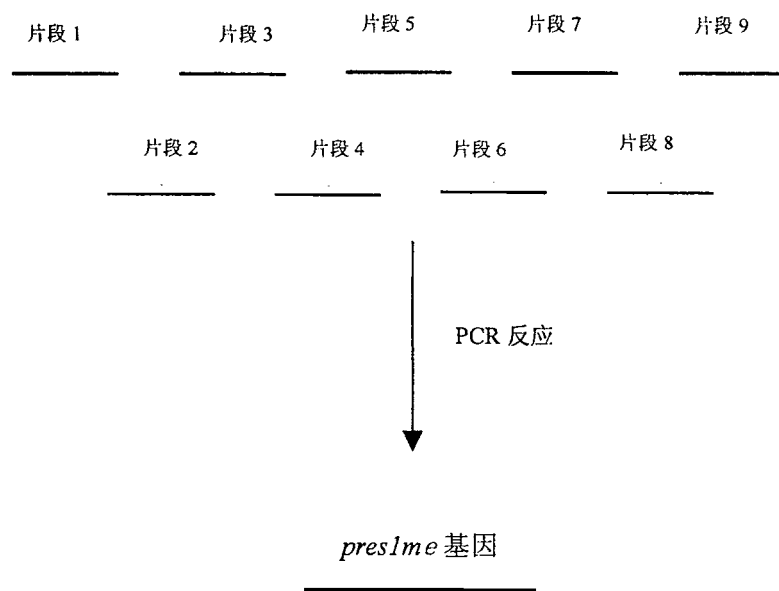


图 2

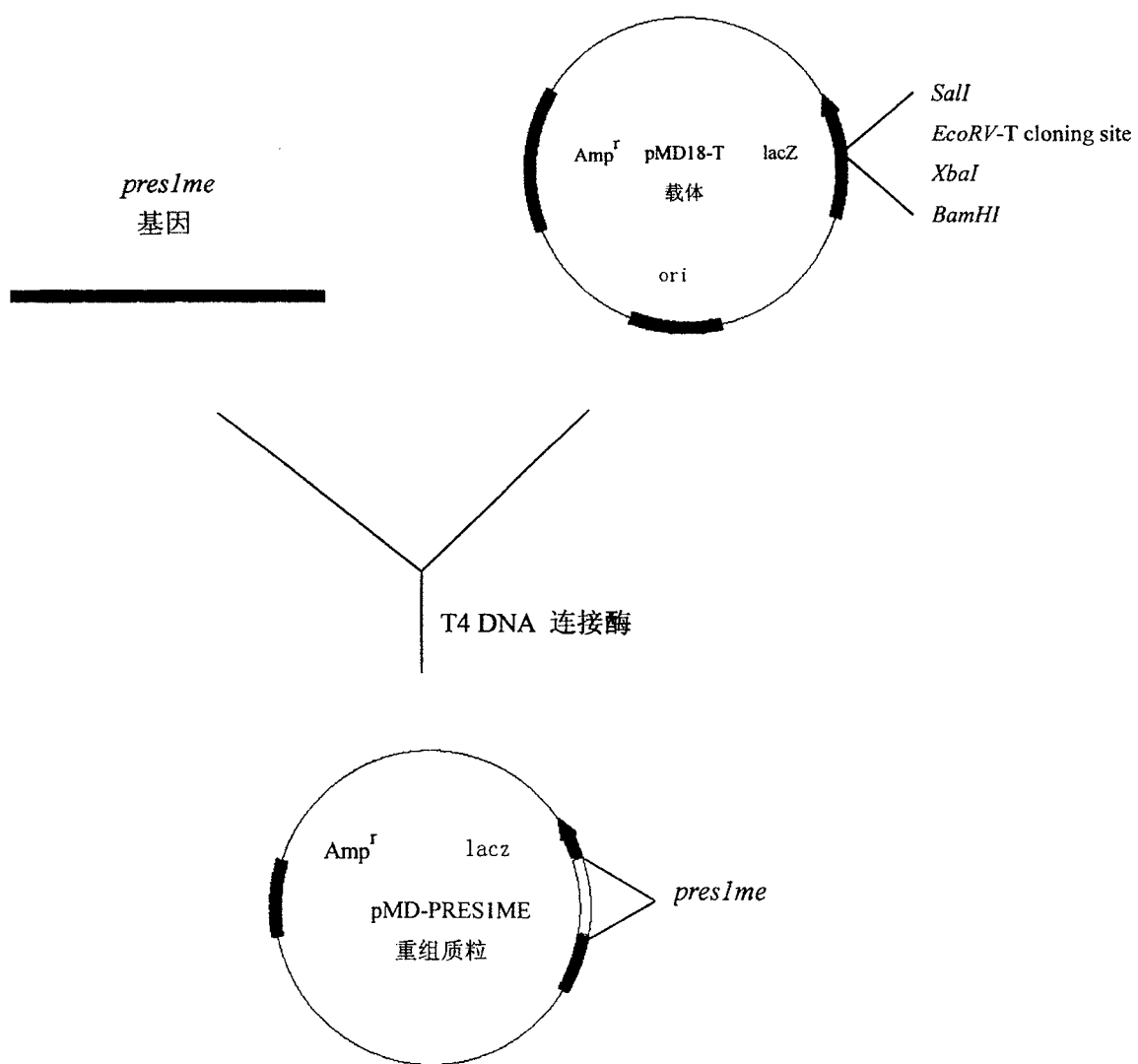


图 3

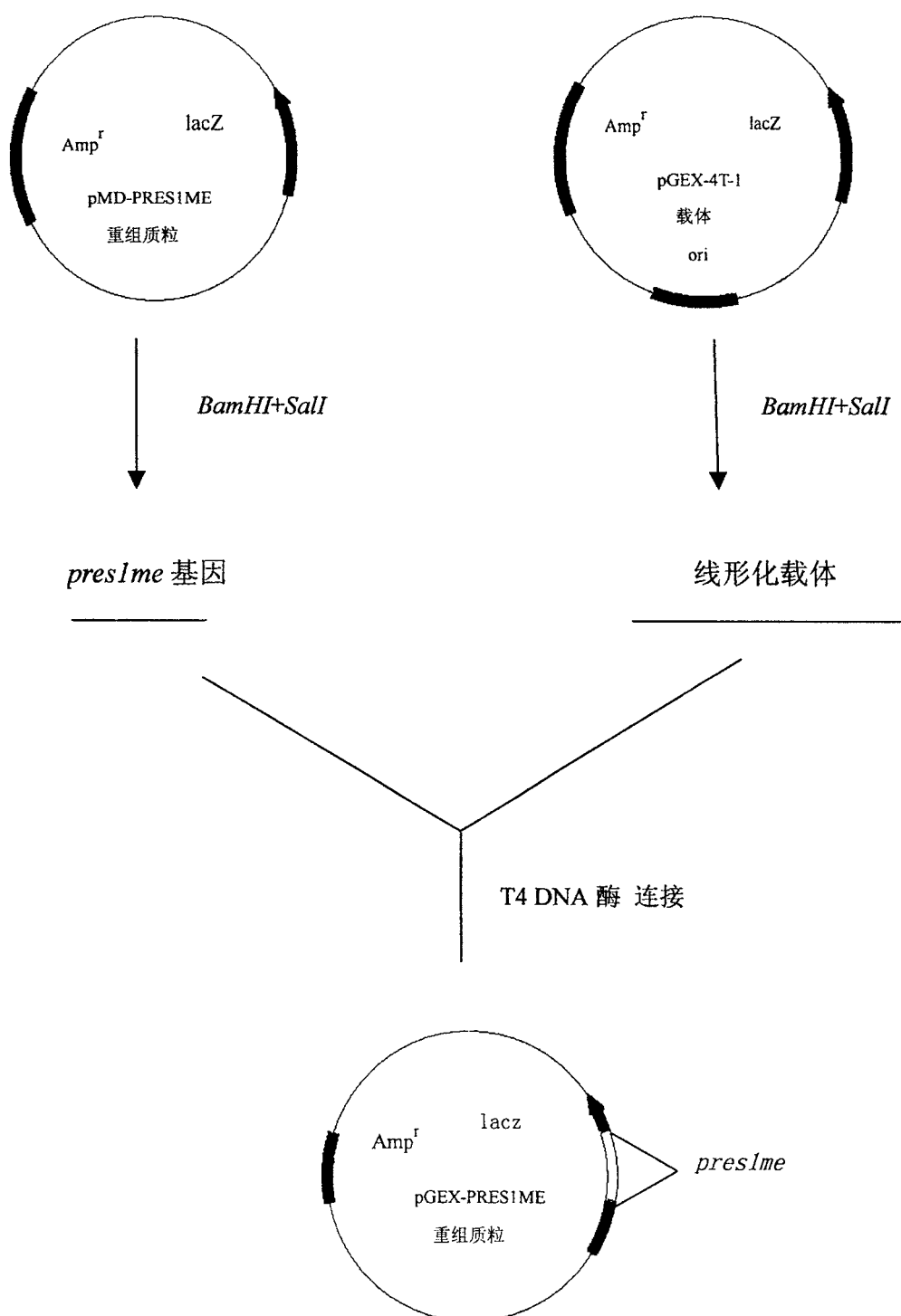
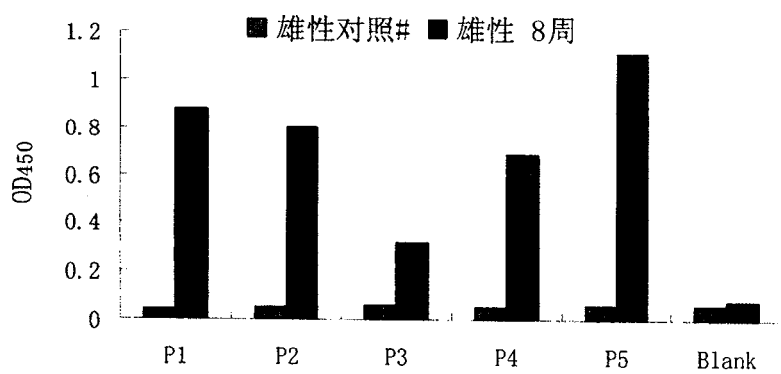


图 4



P₁~P₄ 为 4 条乙肝 Pres1 区表位合成肽; P₅ 为 Pres1 蛋白; Blank 为一无关合成肽

图 5

专利名称(译)	乙型肝炎病毒前S1区多表位抗原的基因克隆及其编码序列		
公开(公告)号	CN100497630C	公开(公告)日	2009-06-10
申请号	CN200510112382.8	申请日	2005-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	上海复星长征医学科学有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海复星长征医学科学有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海复星长征医学科学有限公司		
[标]发明人	龚育平		
发明人	龚育平		
IPC分类号	C12N15/51 C12P19/34 A61K39/29 A61P1/16 A61P31/20 G01N33/576 G01N33/68 G01N33/53		
代理人(译)	王巍		
审查员(译)	杨振宇		
其他公开文献	CN1990874A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物工程技术领域，本发明公开了乙型肝炎病毒前S1区(PreS1)多表位抗原的基因克隆pres1me及其编码序列PRES1ME。pres1me包含了HBV基因组前S1区中B细胞表位区段4段，经研究表明，它与gst基因的原核融合表达产物GST-PRES1ME与乙肝前S1抗原ELISA检测试剂盒的反应结果为阳性，用其制备ELISA板后可在乙肝血清中检测出乙肝前S1抗体，GST-PRES1ME免疫小鼠后的血清能特异识别四条Pres1表位合成肽及前S1全长蛋白。因此，pres1me及其表达产物PRES1ME可用于制备HBV前S1抗体或抗原的检测试剂及乙肝疫苗。